基因工程技术优化透明质酸生产的研究进展*

郜娇娇　　杨树林**

（南京理工大学　南京　210094）

摘要　透明质酸是由葡萄糖醛酸和N-乙酰葡萄糖胺组成的双糖单位聚合而成的直链酸性粘多糖，在医药、化妆品、食品等领域具有广泛市场应用。传统研究通过优化发酵参数改善透明质酸的生产取得显著成效，但趋于上限，天然生产菌株固有的发酵培养基成本高、具有一定致病性等劣势也日益显著。随着分子生物学技术的迅速发展以及对透明质酸合成相关基因研究的不断深入，研究重点逐渐转向利用基因工程技术构建高产、安全、具有特定分子量的透明质酸工程菌株。就有关透明质酸生产菌株基因工程改造的策略及研究进展进行概述和展望。

关键词　透明质酸　多糖　基因工程　分子量

中图分类号　TQ281

透明质酸（hyaluronic acid，HA），又称玻尿酸，是由N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸通过β-1,4和β-1,3糖苷键反复交替连接而成的高分子聚合物。HA是一种生物中普遍存在的酸性粘多糖，如哺乳动物组织（皮肤、滑液、眼睛玻璃体液、脐带等），小球藻病毒以及各种原核生物（A、C族链球菌，多杀性巴氏杆菌，蜡样芽胞杆菌，新型隐球菌等）[1-2]，是目前发现的自然界中保湿性最好的物质。HA因其独特的黏弹性、保湿性、非免疫原性和高生物相容性，在医药、化妆品、食品等领域中广泛应用，包括皮肤填充剂[3]、化妆品、骨关节炎治疗[4]、眼科手术[5]、组织工程支架[6]、腹部手术后的粘连预防[7]和伤口愈合等[8]。2014年HA市场调查报告显示，2012年HA的市场份额为53.2亿美元，2019年预计达到98.5亿美元[9]。

随着大量关于微生物多糖生物合成途径和相关基因的研究成果的获得，HA生产的基因工程方面的研究也逐渐展开并取得显著成效。现阶段，对优良菌株进行基因工程改造，将是一条降低发酵成本、提高HA品质的切实可行的途径。目前，基因工程技术在HA生产中的应用主要从三个方面进行：调控HA分子量、提高HA产量和增强HA生产安全性。

1　HA合成相关基因

对于HA的生物合成途径及其基因表达调控方式进行了大量研究，其中了解最清楚的是链球菌。不同种类链球菌中编码与HA合成相关的基因是高度保守的。合成HA的两个前体是UDP-葡萄糖醛酸(UDP-GlcUA)和UDP-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)，UDP-GlcUA和UDP-GlcNAc在透明质酸合成酶（hyaluronic acid synthase，HAS）的作用下合成HA。链球菌中涉及到HA合成的基因通常以操纵子形式表达，该操纵子在不同种类链球菌中分别由两个、三个或五个基因（*hasAB*、*hasABC*、*hasABCDE*）组成，包括编码HAS的*hasA*、编码UDP-葡萄糖脱氢酶（UGDH）的*hasB*、编码葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶的*hasC*、编码N-乙酰葡糖胺-1-磷酸尿苷转移酶的*hasD* / *glmU*以及编码磷酸葡萄糖异构酶的*hasE* / *pgi*。其中，*hasB*、*hasC*与前体UDP-GlcUA合成相关，*hasD* / *glmU*、*hasE* / *pgi*与前体UDP-GlcNAc合成

收稿日期：2017-05-08　　　修回日期：2017-05-22

* 国家“863”计划资助项目(2014AA022107)

**通讯作者，电子邮箱：yshulin@njust.edu.cn

相关[10]。

2 调控 HA 分子量

HA 的生物学功能和特异性应用取决于其分子量。具有高粘弹性、对细胞高亲和力的高分子量 HA 适用于损伤软骨的愈合，骨关节炎治疗，作为眼科的佐剂等[11]；而短链 HA（2 kDa~3.5 kDa）或 HA 寡糖（长度为 10~20 个糖）对细胞行为也具有特殊的影响，如促进血管生成、诱导炎症介质表达和抑制肿瘤生长等[12-13]。为了扩展 HA 的应用并且制备更好的 HA 生物医学产品，对于有效生产特定分子量 HA 的深入研究是非常重要的[14]。

2.1 通过调控前体的可用性

HA 的分子量受两种前体 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcUA 的浓度的影响[15-16]，UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAc 之间的竞争影响链球菌 HAS 的聚合速率[17-18]，因此，可能存在两种前体的最佳比例以实现最大 HA 分子量[19]。Hmar 等[20]发现当两种前体的比例更接近 1 时，产生较高分子量的 HA；当该比例与 1 相差甚远时，产生较低分子量的 HA。然而许多研究发现[21-23]，相对于前体 UDP-GlcUA，前体 UDP-GlcNAc 的浓度才是 HA 分子量的限制因素。低浓度的 UDP-GlcNAc 迫使 HAS 切割糖链并将聚合物释放到细胞外基质[24]。Chen[19]等发现在较低浓度 UDP-GlcNAc 存在时，UDP-GlcNAc 水平和分子量之间保持正相关性，然而这种关系在较高浓度 UDP-GlcNAc 存在下停滞。这些研究表明，虽然使用基因工程方法提高 HA 前体水平可以提高 HA 分子量，但是当前体的量超过一定浓度时则不再利于分子量的增加。

2.2 通过调控 HAS 与前体浓度的比率

Hmar 等[20]将来源兽疫链球菌的 HA 合成相关基因（*hasA*、*hasB*）整合到乳酸乳球菌中，发现 HA 合酶（*hasA*）和前体基因（*hasB*）在细胞中的相对表达是控制 HA 分子量的重要因素。当 *hasA* 和 *hasB* 拷贝数之比较高时，细胞内每个 HAS 分子能够分配到的用来合成 HA 的前体就相对较少，合成的 HA 糖链就相对较短，反之则合成较长糖链的 HA。

Jia 等[25]引入分别携带来自多杀性巴氏杆菌的 HA 合酶 pmHAS 基因（木糖启动子控制下）和来自枯草芽孢杆菌的前体基因 *tuaD*、*gtaB*（IPTG 启动子控制下）的两个诱导型人工操纵子，通过分别调控 pmHAS 和前体基因的诱导表达开始时间，使得重组枯草芽孢杆菌得以产生具有受控分子量的 HA，能够合成范围为 8 $\times10^3$~5.4$\times10^6$ Da 的受控分子量 HA。

2.3 通过调控 HAS 的活性

HAS 中在调控 HA 分子量方面起着至关重要的作用[26]。Medina[27]对来自类马链球菌的 seHAS 的 Lys48 残基进行修饰(突变为 Glu 或 Phe)，发现 HA 分子量降低；Weigel 等[28]利用基因定点突变技术对 seHAS 中的 4 个 Cys 进行突变，发现当 Cys262 和 Cys281 突变为 Ala 时，HA 分子量降低了 38% 。

Jeong[29] 在将来自非洲爪蟾的 HAS（*xlhasA2*）和不同组合的前体基因引入毕赤酵母中表达的基础上，为了降低 HAS 表达，将 *xlhasA2* 基因中的强 AOX1 启动子用弱 AOX2 启动子代替，其将 HA 的分子量从 1.2 MDa 增加到 2.1MDa。

2.4 通过调控透明质酸酶的表达量

透明质酸酶是一种能水解 HA 糖链的酶。Jin 等[30]在构建共表达兽疫链球菌 HAS 和枯草芽孢杆菌前体基因的枯草芽孢杆菌工程菌的基础上，进一步引入水蛭来源的透明质酸酶编码基因 *LHyal* 整合至枯草芽孢杆菌染色体上，并对 *LHyal* N 端进行修饰以高效表达，分别采用不同强度的核糖体结合位点（RBS）序列来调控透明质酸酶的表达量，得到范围为 2.20$\times10^3$~1.42$\times10^6$ Da 的特定分子量 HA。

已经开发了许多化学酶合成方法用于合成 HA 寡糖[31-32]，然而，此方法过程复杂、耗时，碳水化合物寡糖主链稀少，并且所用底物 UDP-糖昂贵，限制了在大规模生产中的应用。相比之下，Jin 等[30]的通过透明质酸酶的酶解反应产生 HA 寡糖的方法是有工

业生产吸引力的，因为其具有操作条件温和，高降解速率和高产物均一性等独特优点。

此外，Hmar 等[20]将来自兽疫链球菌的 HA 合成相关基因（*hasA-hasB-hasC*）整合到乳酸乳球菌的染色体中，发现通过染色体整合的方式不仅消除了由于质粒表达系统不稳定性而降低生产率的固有缺点，而且与质粒表达的菌株（2 MDa）相比，基因组整合的菌株产生更高分子量（3.5~4 MDa）的 HA。

3 提高 HA 产量

随着 HA 应用的增加，市场份额多年来持续增长，提高 HA 产量成为提高经济效益的重要手段。大量的传统研究通过优化发酵参数提高 HA 的产量取得显著成效，但趋于上限，而利用基因工程的方法正在提供新的研究思路。

3.1 超表达前体基因

尽管 HA 的产生可以通过单独表达 *hasA* 实现，但与 *hasA* 同时共表达前体基因可以显著增强 HA 生产。Chien 等[33]将兽疫链球菌 *szhasA* 基因整合到枯草芽孢杆菌的基因组中，同时分别共表达兽疫链球菌中 UGDH 基因（*szhasB*）、枯草芽孢杆菌中 UGDH 基因（*tuaD*），结果表明与 *szhasA* 共表达 *szhasB* 或 *tauD* 可以增加 HA 产量至少 2 倍，并且 *tauD* 的共表达比 *hasB* 更有效地增加 HA 产量。Prasad SB 等[34]在引入兽疫链球菌中 HA 合成相关基因的乳酸乳球菌中发现，导入 *szhasA*、*szhasB*、*szhasC* 的重组菌的 HA 产量比只导入 *szhasA*、*szhasB* 的重组菌提高了 119%。

Jia 等[25]通过在枯草芽孢杆菌中同时引入来自多杀性巴氏杆菌的 pmHAS 合成基因和不同的前体基因组合，构建了 3 个工程菌：TPG223 (pmHAS/*tuaD-gtaB*)、PG6181 (pmHAS/*gcaD*)、PP6502 (pmHAS/*pgi*)，与 Widner 等[35]的研究结论一致，菌株 TPG223 (pmHAS/*tuaD-gtaB*)达到最高产量，证明负责 UDP-GlcUA 合成途径的 *tuaD* 和 *gtaB* 对于枯草芽孢杆菌中的高浓度 HA 的产生是必需的。与只含有 pmHAS 的菌株（几乎没有检测到 HA）相比，与 UDP-GlcNAc 合成相关的 *gcaD* 或 *pgi* 的过表达也对 HA 的产量有促进作用，但这种促进效应低于 UDP-GlcUA。得出结论，UDP-GlcUA 的表达水平限制了重组枯草芽孢杆菌中的 HA 合成。显然，UDP-GlcUA 而非 UDP-GlcNAc 是微生物合成 HA 产量的限制因素，因为各类微生物自身合成的 UDP-GlcNAc 已足以满足 HA 的合成[36]。

3.2 抑制与 HA 合成竞争的代谢途径

生产 HA 过程中与之竞争碳源和能量的包括三个代谢过程：生物质的合成、磷酸戊糖途径和乳酸合成（通过糖酵解途径）。通过抑制与 HA 竞争碳源及能量的途径可提高 HA 产量。

由 *pfkA* 编码的 6-磷酸果糖激酶是糖酵解途径中的第一种限速酶。Jin 等[30]在构建的枯草芽孢杆菌重组菌中，分别用 TTG 或 GTG 替换 *pfkA* 的起始密码子 ATG，以适度下调 *pfkA* 表达，从而为 HA 合成提供更多的果糖-6-磷酸。摇瓶水平下，重组枯草芽孢杆菌 E168G（GTG）和 E168T（TTG）与 E168A（ATG）相比，HA 产量分别增加 13%和 18%。

3.3 补充能量代谢途径

HA 的生物合成是一种高能耗过程。菌体内众多代谢过程以及合成 HA 都要消耗 NAD^+，而 NAD^+的再生则主要依靠丙酮酸转化成乳酸途径，在发酵过程中，多达 80%的碳源被代谢成乳酸，不仅消耗了大量碳源，而且对菌体生长和 HA 合成都有抑制作用。如果考虑通过基因工程的手段，构建其他的代谢途径获得能量的再生，将有利于 HA 的合成。

合成聚羟基丁酸（Polyhydroxyalkanoic acids，PHB）时可以将 NADH 氧化为 NAD^+，从而完成 NAD^+循环避免 NADH 的堆积。张晋宇[37]克隆 PHB 合成基因 *phbCAB*，导入兽疫链球菌，构建了一个新的 NAD^+补给途径，发酵罐水平下乳酸合成从 64 g/L 降低到 41 g/L，同时 HA 产量提高了 1 g/L 左右；

Wu 等[38]将 *phbCAB* 导入兽疫链球菌，摇瓶水平下 HA 产量提高了 29%，乳酸产量降低了 29%。

为了补充 HA 生物合成消耗的能量，Chien 等[33]将透明颤菌血红蛋白合成基因 *vgb*(Vitreoscilla hemoglobin gene,*vgb*) 与 HA 合成相关基因在兽疫链球菌中共表达。通过 *vgb* 的表达，HA 的产量增加了 100%；此外，Chong 等[39]尝试在兽疫链球菌中过表达 NADH 氧化酶以增加能量产生，成功地将 ATP 产量提高了 30%。然而，它只导致 15% 的生物量增加，而不是预期的 HA 合成的增加。Kaur 等[40]在含有来自兽疫链球菌的异源基因（*hasABC*/*hasABD*）的乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，ldh）突变体（敲除三个 ldh 基因中的两个）重组乳酸乳球菌株中发现， ldh 突变菌株中乳酸生产的转移导致更高的 $NAD^+/NADH$ 比，HA 的产量增加了 3 倍。

3.4 提高发酵液溶氧

由于 HA 具有特殊的粘弹性，随着发酵过程中 HA 的积累导致发酵液粘度增加，DO 水平急剧降低，限制了 HA 的产量增加。透明质酸酶可将 HA 降解为小分子糖链，从而使发酵液粘度降低，DO 增加。Jin 等[30]在构建共表达兽疫链球菌 HA 合酶和枯草芽孢杆菌前体基因的枯草芽孢杆菌工程菌的基础上，引入水蛭来源的透明质酸酶编码基因 *LHyal* 整合至枯草芽孢杆菌，在 3 L 发酵罐水平下，HA 的产量从 5.96 g/L 显著增加到 19.38 g/L，是目前微生物发酵法生产 HA 的最高产量。

4 增强 HA 生产安全性

国内外工业微生物发酵法生产 HA 的主要菌种为兽疫链球菌，该菌具有一定的致病性。利用基因工程技术改善 HA 生产过程以及产品的安全性主要有敲除 HA 天然生产菌毒力基因和利用安全异源宿主合成 HA 两种方法。

4.1 敲除 HA 天然生产菌毒力基因

链球菌毒力因子主要包括透明质酸分解酶、菌体表面蛋白、溶血素 S、溶血素 Hylc 以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶等[41]。如刘玉川等[42]在兽疫链球菌中将编码能够引起宿主细胞溶血的溶血素 S (streptolysin S，SLS）的 *sagA* 基因敲除，获得了溶血活性极低的菌株。但 HA 天然生产菌中毒力因子过多且尚未被完全测定，潜在的毒力基因等待进一步发现。因此通过敲除 HA 天然生产菌毒力基因的方法，目前只能降低而不能完全消除菌株毒力，且毒力基因过多操作复杂难以实现，现已逐渐被利用安全异源宿主合成 HA 的方法取代。

4.2 利用安全异源宿主合成 HA

由于 HA 天然生产菌发酵培养基成本较高，且可能产生的毒素和热原的的风险难以完全消除，因此，大量研究正在探索 HA 生产的替代来源。HA 已经在广泛的安全异源宿主中得以产生，包括：乳酸乳球菌[43]、大肠杆菌[44]、枯草芽孢杆菌[33]、酿酒酵母[45]、毕赤酵母[29]、谷氨酸棒状杆菌等[46]。由于枯草芽孢杆菌表达系统具有分泌能力强，已测序，可用价格低廉的基本培养基发酵，同时生产的 HA 不与细胞粘附易于下游分离，发酵中不产毒素和透明质酸酶等优势，已被丹麦 Novozymes 公司申请专利并成功上市。

此外，利用化学酶合成方法通过无细胞系统合成 HA [47]，是增强 HA 生产安全性的另一个思路，但此法可操作性及产率较差，很难应用于实际生产中。

5 展望

基因工程技术提供了一种新的策略，用于优化 HA 产品的生产，并且可以扩展到其它多糖的生产，如肝素原和软骨素等[48]。但仍有以下几点挑战需要更多的研究致力于加深对 HA 最优生产条件的认识：（1）尽管已经提出了 HA 聚合模型，并且已经阐明了影响分子量的一些关键的细胞内代谢物，但对于 HA 的链终止及跨膜转运的调控机制目前尚无统一的认识。因此，分子量的调节仍然是一个挑战。为了了解链终止及跨膜转运

的机制，我们需要深入探究不同类别 HAS 的体内动力学，并研究细胞内的代谢物浓度，酶活和 HA 分子量三者之间的具体联系。实际上，对于体外研究得出的链终止机制是否与体内链终止机制相同仍存在争议。因此，体外研究的数据必须非常严谨地解释；（2）DO 水平是 HA 产量的限制因素，随着 HA 的积累，由于其粘弹性导致发酵液粘度增加，DO 水平急剧降低，即使在配备有良好通气和搅拌装置的发酵罐中，也难以在整个发酵过程中保持高的 DO 水平，从而将 HA 产量限制在 6~10 g/L[30]。因此，增加 DO 水平提高 HA 产量仍然是一个挑战；（3）在实际生产中难以获得既高产量又高分子量的 HA，许多研究都发现 HA 产量与分子量之间呈反比关系[9,29,33]，如何平衡二者的关系也是生产中需要考虑的问题；（4）近年来，焦点一直是对于更安全的异源宿主如枯草芽孢杆菌的研究。枯草芽孢杆菌是生产 HA 的最佳异源宿主[49]，然而，即使在高度遗传修饰的枯草芽孢杆菌中，HA 产量及分子量都与天然 HA 生产菌株相差甚远，且在工程菌中尚难真正实现 HA 分子量的控制。可见，兽疫链球菌作为 HA 主要生产菌株的地位目前尚难撼动。综合运用基因工程和代谢工程的方法，进一步开展对异源宿主的研究，建立一套适用于工业生产要求的发酵方案生产更好服务于社会的安全、高产、高纯度的特定分子量 HA，是今后的研究重点。

参考文献

[1] Vigetti D, Karousou E, Viola M, et al. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(8): 2452-2459.

[2] Viola M, Vigetti D, Karousou E, et al. Biology and biotechnology of hyaluronan. Glycoconjugate Journal, 2015, 32 (3): 93-103.

[3] Anderegg U, Simon J C, Averbeck M. More than just a filler-the role of hyaluronan for skin homeostasis. Exp Dermatol, 2014, 23(5): 295-303.

[4] Ammar T Y, Pereira T A P, Mistura S L L, et al. Viscosupplementation for treating knee osteoarthrosis: review of the literature. Rev Bras Ortop, 2015, 50(5): 489-494.

[5] Mencucci R, Boccalini C, Caputo R, et al. Effect of a hyaluronic acid and carboxymethylcellulose ophthalmic solution on ocular comfort and tear-film instability after cataract surgery. J Cataract Refract Surg, 2015, 41(8): 1699-1704.

[6] Nesti L J, Li W J, Shanti R M, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam. Tissue Eng Part A, 2008, 14(9): 1527-1537.

[7] Robert L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. Pathologie Biologie, 2015, 63(1): 32-34.

[8] Ghosh S, Hoselton S A, Dorsam G P, et al. Hyaluronan fragments as mediators of inflammation in allergic pulmonary disease. Immunobiology, 2015, 220 (5): 575-588.

[9] De Oliveira J D, Carvalho L S, Gomes A M V, et al. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. Microb Cell Fact, 2016, 15(1): 119.

[10] Blank L M, Hugenholtz P, Nielsen L K. Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. J Mol Evol, 2008, 67(1): 13-22.

[11] Marcellin E, Steen J A, Nielsen L K. Insight into hyaluronic acid molecular weight control. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(16): 6947-6956.

[12] Sheng J Z, Ling P X, Zhu X Q, et al. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer. J Appl Microbiol, 2009, 107(1): 136-144.

[13] Aya K L, Stern R, Chen W Y. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player.Wound Repair Regen, 2014, 22(5): 579-593.

[14] Yuan P, Lv M, Jin P, et al. Enzymatic production of specifically distributed hyaluronan oligosaccharides. Carbohydr Polym, 2015, 129: 194-200.

[15] Chen W Y, Marcellin E, Hung J, et al. Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. J Biol Chem, 2009, 284(27): 18007-18014.

[16] Marcellin E, Nielsen L K, Abeydeera P, et al. Quantitative analysis of intracellular sugar phosphates and sugar nucleotides in encapsulated streptococci using HPAEC-PAD. Biotechnol J, 2009, 4(1): 58-63.

[17] Tlapak-Simmons V L, Baggenstoss B A, Kumari K, et al. Kinetic characterization of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. J Bio Chem, 1999, 274(7): 4246-4253.

[18] Marcellin E, Chen W Y, Nielsen L K. Understanding plasmid effect on hyaluronic acid molecular weight produced by *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. Metabolic Engineering, 2010, 12(1): 62-69.

[19] Chen W Y, Marcellin E, Steen J A, et al. The role of hyaluronic acid precursor concentrations in molecular weight control in *Streptococcus zooepidemicus*. Mol Biotechnol, 2014, 56(2): 147-156.

[20] Hmar R V, Prasad S B, Jayaraman G, et al. Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (has) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis*. Biotechnol J, 2014, 9(12): 1554-1564.

[21] Swaminathan J, Ramachandran K B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48 (2): 148-158.

[22] Jokela T A, Jauhiainen M, Auriola S, et al. Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines. J Biol Chem, 2008, 283(12): 7666-7673.

[23] Badle S S, Jayaraman G, Ramachandran KB. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. Bioresour Technol, 2014, 163: 222-227.

[24] Kumari K, Weigel P H. Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from Group C *Streptococcus equisimilis*. J Biol Chem, 1997, 272(51): 32539-32546.

[25] Jia Y N, Zhu J, Chen X F, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. Bioresour Technol, 2013, 132: 427-431.

[26] Zhang L, Huang H, Wang H, et al. Rapid evolution of hyaluronan synthase to improve hyaluronan production and molecular mass in *Bacillus subtilis*. Biotechnol Lett, 2016, 38(12): 2103-2108.

[27] Medina A P, Lin J L, Weigel P H. Hyaluronan synthase mediates dye translocation across liposomal membranes. BMC Biochemistry, 2012, 13(2): 1-9.

[28] Weigel P H, Baggenstoss B A. Hyaluronan synthase polymerizing activity and control of product size are discrete enzyme functions that can be uncoupled by mutagenesis of conserved cysteines. Glycobiology, 2012, 22(10): 1302-1310.

[29] Jeong E, Shim W Y, Kim J H. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. J Biotechnol, 2014, 185: 28-36.

[30] Jin P, Kang Z, Yuan P, et al. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. Metab Eng, 2016, 35: 21-30.

[31] DeAngelis P L, Oatman L C, Gay D F. Rapid chemoenzymatic synthesis of monodisperse hyaluronan oligosaccharides with immobilized enzyme reactors. J Biol Chem, 2003, 278(37): 35199-35203.

[32] Boltje T J, Buskas T, Boons G J. Opportunities and challenges in synthetic oligosaccharide and glycoconjugate research. Nat Chem, 2009, 1(8): 611-622.

[33] Chien L J, Lee C K. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. Biotechnol Prog, 2007, 23(5): 1017-1022.

[34] Prasad S B, Jayaraman G, Ramachandran K B. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(1): 273-283.

[35] Widner B, Behr R, Von Dollen S, et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(7): 3747-3752.

[36] Izawa N, Serata M, Sone T, et al. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. J Biosci Bioeng, 2011, 111(6): 665-670.

[37] 张晋宇. 表达 *phbCAB* 基因对兽疫链球菌中乳酸及透明质酸产量的影响. 清华大学, 生命科学与技术系, 2005.
Zhang J Y. Effect of expressing PHB synthesis genes *phbCAB* gene on production of latate and hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. Tsinghua University , Department of life science and technology, 2005.

[38] Wu X M, Gao H J, Tian G, et al. Transformation of *Streptococcus zooepidemicus* with genes responsible for polyhydroxybutrate synthesis. Tsinghua Science and Technology, 2002, 7(4): 387-392.

[39] Chong B F, Nielsen L K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. J Biotechnol, 2003, 100 (1): 33-41.

[40] Kaur M, Jayaraman G. Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis*. Metab Eng Commun, 2016, 3: 15-23.

[41] Ma Z, Geng J, Yi L, et al. Insight into the specific virulence related genes and toxin-antitoxin virulent pathogenicity islands in swine streptococcosis pathogen *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* strain ATCC35246. BMC Genomics, 2013, 14: 377.

[42] 刘玉川, 李宇兴, 赖永勤等. 透明质酸生产菌溶血素 S 基因缺失突变菌株的构建及其特性. 微生物学报, 2016, 56(11): 1755-1765.
Liu Y C, Li Y X, Lai Y Q, et al. Construction and characterization of hemolysin S gene mutant strain

producing hyaluronic acid. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(11): 1755-1765.

[43] Prasad S B, Ramachandran K B, Jayaraman G. Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94(6): 1593-1607.

[44] Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. Metab Eng, 2008, 10(1): 24-32.

[45] Deangelist P L, Achyuthan A M. Yeast-derived recombinant DG42 protein of Xenopus can synthesize hyaluronan in vitro. J Biol Chem, 1996, 271(39): 23657-23660.

[46] Cheng F, Gong Q, Yu H, et al. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant Corynebacterium glutamicum. Biotechnol J, 2016, 11(4): 574-584.

[47] Sze J H, Brownlie J C, Love C A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. 3 Biotech, 2016, 6(1): 67.

[48] Jin P, Zhang L, Yuan P, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*. Carbohydr Polym, 2016, 140: 424-432.

[49] Tlustá M, Krahulec J, Pepeliaev S. Production of hyaluronic acid by mutant strains of group C Streptococcus. Mol Biotechnol, 2013, 54(3): 747-755.

Advances in Optimization of Hyaluronic Acid Production by Genetic Engineering Technology

GAO Jiao-jiao　　YANG Shu-lin

(School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract　Hyaluronic acid is a linear acid mucopolysaccharide composed of repeating disaccharide glucuronic acid and N-acetyl-glucosamine units, which is widely used in medicine, cosmetics, food and other fields. Traditional studies have made significant achievements in improving the production of hyaluronic acid by optimizing the fermentation parameters, but have reached the upper limit, and the natural strains have the increasing disadvantages of high cost of fermentation medium and pathogenicity. With the rapid development of molecular biology technology and the continuous research on the genes related to hyaluronic acid synthesis, the research focus has gradually shifted to the use of genetic engineering technology to construct high yield, safe and specific molecular weight hyaluronan genetically engineered strains. In this paper, the strategies and research progress of genetic engineering for the production of hyaluronic acid were reviewed.

Key words　hyaluronic acid　polysaccharide　genetic engineering　molecular weight